



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

출원 번호 : 특허출원 2004년 제 0070820 호
Application Number 10-2004-0070820

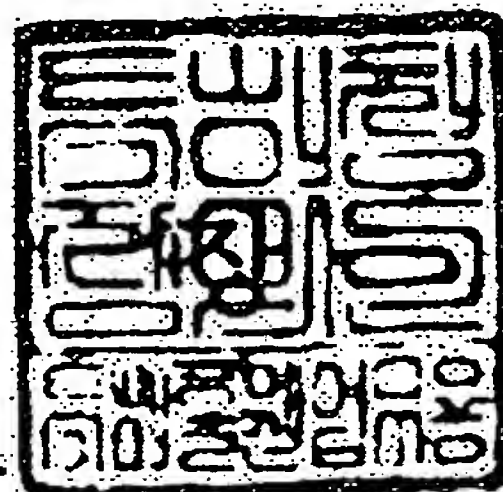
출원 일자 : 2004년 09월 06일
Date of Application SEP 06, 2004

출원인 : 고려대학교 산학협력단
Applicant(s) Korea University Industry and Academy
Cooperation Foundation

2005 년 09 월 08 일

특 허 청

COMMISSIONER



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.09.06
【발명의 국문명칭】	고구마 유래 식물체 당 유도성 프로모터 염기서열 및 이를 포함하는 식물체 당 유도성 발현 벡터
【발명의 영문명칭】	DNA nucleotide sequence for directing sucrose-inducible high level expression in plant and plasmid vector using the same
【출원인】	
【명칭】	고려대학교 산학협력단
【출원인코드】	2-2004-017068-0
【대리인】	
【성명】	김선애
【대리인코드】	9-1999-000392-1
【포괄위임등록번호】	2004-049474-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	배정명
【성명의 영문표기】	BAE, Jung Myung
【주민등록번호】	580810-2849919
【우편번호】	139-931
【주소】	서울특별시 노원구 중계본동 삼성아파트 105동 1103호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	곽만섭
【성명의 영문표기】	KWAK, Man Sup

【주민등록번호】 750808-1650711
【우편번호】 142-070
【주소】 서울특별시 강북구 수유동 192-69번지
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 노설아
【성명의 영문표기】 NOH, Seol Ah
【주민등록번호】 770423-2772817
【우편번호】 136-051
【주소】 서울특별시 성북구 동선동1가 122번지 302호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 신정섭
【성명의 영문표기】 SHIN, Jeong Sheop
【주민등록번호】 590125-1119911
【우편번호】 132-024
【주소】 서울특별시 도봉구 방학4동 청구아파트 106동 205호
【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 이신우
【성명의 영문표기】 LEE, Shin Woo
【주민등록번호】 570206-1790212
【우편번호】 660-280
【주소】 경남 진주시 칠암동 519-6번지 102호
【국적】 KR

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

【서열개수】 5

【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정
에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인

김선애 (인)

【수수료】

【기본출원료】	0	면	38,000	원
---------	---	---	--------	---

【가산출원료】 23 면 0 원

【우선권주장료】 0 건 0 원

【심사청구료】	8	항	365,000	원
---------	---	---	---------	---

【합계】 403,000 원

【감면사유】 전담조직

【감면후 수수료】 201,500 원

【첨부서류】 1.전담조직임을 증명하는 서류_1통

【요약서】

【요약】

본 발명은 고구마 유래 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGPI*) 프로모터 염기서열 중 식물체에서 당 유도성 발현을 유도하는 염기서열(서열번호 1), 상기 염기서열을 포함하는 식물체 당 유도성 발현 플라스미드 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체내에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 상기한 본 발명에 의한 당 유도성 발현 프로모터는 당을 처리하였을 때 그 활성이 8 내지 11배 증가되므로, 이는 보편적으로 쓰이는 CaMV35S 프로모터에 비해 12 내지 15배 증가한 활성이다. 따라서, 본 발명에 의한 프로모터는 식물체내에서 비교적 많은 양의 당이 축적되는 저장기관에서 유용 의료, 산업용 단백질을 대량 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

프로모터, ADP-글루코즈 인산화 효소, 고구마, 당, 저장기관, 당 유도성

【명세서】

【발명의 명칭】

고구마 유래 식물체 당 유도성 프로모터 염기서열 및 이를 포함하는 식물체 당 유도성 발현 벡터{DNA nucleotide sequence for directing sucrose-inducible high level expression in plant and plasmid vector using the same}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 고구마 유래 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위의 염기서열을 나타내는 도면.
- <2> 도 2a는 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 고구마 유래 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위를 포함하는 형질전환용 바이너리 벡터(이하, 'pSPagp1-101'이라 함)를 나타내는 모식도.
- <3> 도 2b는 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 고구마 유래 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위를 포함하는 일시적 발현 분석용 벡터(이하, 'pSPagp1-221'이라 함)를 나타내는 모식도.
- <4> 도 3은 본 발명에 의한 pSPagp1-101 벡터를 이용하여 형질전환시킨 애기장대 식물체를 조직 화학적인 방법으로 GUS를 염색시켜 관찰한 조직별 발현 양상을 나타내는 도면.
- <5> 도 4는 본 발명에 의한 pSPagp1-101 벡터를 이용하여 형질전환시킨 애기장대 식물체에 당 처리를 한 후 GUS를 정량적인 방법으로 분석하여 본 발명에 의한 프로

모터의 당 유도성을 확인한 도면.

- <6> 도 5는 본 발명에 의한 pSPagp1-221 벡터를 이용하여 당근의 저장뿌리에서 일시적 발현을 분석한 결과를 나타내는 도면.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <7> 본 발명은 고구마 유래 식물체 당 유도성 프로모터 염기서열, 이를 포함하는 식물체 당 유도성 발현 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체내에서 발현시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 고구마 유래 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGP1*) 프로모터 염기서열 중 식물체에서 당 유도성 발현을 유도하는 염기서열, 상기 염기서열을 포함하는 식물체 당 유도성 발현 플라스미드 벡터 및 상기 벡터를 이용하여 외래 유전자를 식물체내에서 발현시키는 방법에 관한 것이다.

- <8> 작물분자육종은 모든 종(種)의 유전자를 재료로 사용할 수 있으며 기존의 게놈 단위로만 가능하던 육종기술을 유전자 단위로 끌어내려 무한대의 육종 효과를 미세하게 조절할 수 있다는 측면에서 차세대 농업을 이끌어 갈 핵심적인 기술이다.

- <9> 이러한 작물분자육종은 기술의 효과를 극대화시키려면 1) 여러 가지 식물의 유전자를 대표할 수 있는 많은 유전자 데이터의 축적이 선행되어야 하며, 2) 다양한 작물의 형질전환 시스템이 구축되어야 하며, 3) 외부에서 삽입된 유전자의 발현

을 조절할 수 있는 다양한 프로모터의 개발이 선행되어야 한다.

10> 이에 국외에서는 1980년대 초반부터 식물 유전자의 발현을 조절하는 프로모터에 대한 연구가 진행되어 왔다. 꽃양배추 모자이크 바이러스(Cauliflower mosaic virus)의 프로모터가 식물 전 조직에서 강한 발현을 유도할 것이라고는 가능성이 제시되고(Hohn et al., 1982, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 96: 193-236), 상기 프로모터의 염기서열이 밝혀지고(Odell et al., 1985, *Nature* 313:810-812), 식물체내에서 강한 발현이 증명되었다(Sanders et al., 1987, *Nucleic Acids Res.* 15: 1543-58). 그 후 CaMV 35S(특허번호: JP1993192172-A1) 프로모터는 식물에서 가장 많이 쓰이는 보편적인(universal) 프로모터가 되었다.

11> 한편, CaMV 35S 이후 식물체내에서 생리적(biotic) 혹은 비생리적인(abiotic) 조건하에서 활성이 증가되는 유도성 프로모터에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다.

12> 이 중, 당 처리에 의해 그 활성이 증가되는 당 유도성 프로모터에 관한 연구도 활발하게 진행되고 있는데, 이러한 당 유도성 프로모터는 식물체에서 당으로부터 합성되는 전분의 축적량이 비교적 많은 저장기관 특히 저장뿌리 조직에서 유용 의료, 산업용 단백질(예, Interferon, growth hormone, Lactoferrin, Phytase 등)이 대량으로 생산되는 것을 유도할 수 있는 장점이 있다.

13> 이러한, 당 유도성 프로모터에 대한 연구는 주로 저장기관에 축적되는 저장 단백질 유전자들 혹은 전분합성에 관련되는 유전자들을 중심으로 이루어져 왔다.

14> 그 예로서 감자 괴경의 저장 단백질인 파타틴을 코딩하는 유전자의 프로모터

의 활성이 당에 의해 증대됨이 확인되었으며(Rocha-Sosa et al., 1989, EMBO J 8, 23-31; Wenzler et al., 1989a, Plant Mol. Biol. 12, 41-50; Wenzler et al., 1989b, Plant Mol. Biol. 13, 347-354), 이 프로모터의 당 유도성에는 -344 부위의 특정 염기서열(B 서열)이 필요하다고 밝혀져 있다(Grierson et al., 1994, Plant J, 5, 815-826).

15> 또한, 두가지의 감자 당합성 효소(Sucrose synthase) 유전자들 (*Sus3* 과 *Sus4*) 중 *Sus4*의 발현이 당 유도성으로 확인되었으며(Salanoubat and Belliard, 1989, GENE 84, 181-185), *Sus4* 유전자의 프로모터 염기서열 중 -1500 내지 -267 염기서열과 3' 비번역 부위, 그리고 1612-bp 리더인트론(leader intron)도 당 유도성 활성화에 필수적이라고 보고되었다(Fu et al., 1995, Plant Cell 7, 1387-1394).

16> 그리고, 옥수수 전분분지효소 I(starch-branching enzyme I, SBE1) 유전자의 프로모터가 당에 반응하여 활성이 증가됨이 확인되었으며, 이러한 당 유도성에는 -314 내지 -145 부위가 필수적이라고 밝혀졌다(Kim and Guiltinan, 1999, Plant Physiology 121, 225-236).

17> 고구마 β -아밀레이제 유전자의 프로모터의 활성이 당에 의해 유도되는 것이 확인되었으며, 이 당 유도성 활성화에는 -901 내지 -820 부위가 필수적이며, 이 중에 서도 TGGACGG 염기서열이 조절인자로 작용한다고 밝혀졌다(Maeo et al., 2001, Plant Mol. Biol. 46, 627-637).

18> 한편, 식물체 내의 전분 합성에 관련되어 그 함량을 조절하는 결정적 효소인 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자 프로모터들이 토마토와 애기장대에서 당 유도성

으로 보고되었으며(Siedlecka et al., 2003, Planta 217, 184-192; Li et al., 2002, Plant Science 162, 239-244), 이들 중 애기장대 프로모터는 일반적으로 단백질 탈인산화 효소 I과 2A(phosphatase I and 2A)의 억제제(inhibitor)인 오카다산(okadaic acid)에 의해 그 활성이 감소한다고 보고되었다.

19> 한편, 고구마 유래 2가지 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자들(*ibAGP1* 과 *ibAGP2*) 중 *ibAGP1*(종전에는 *ibAGP-sTL1*으로 명명됨)이 당에 의해 그 발현이 증가함을 확인된 바 있으며(Bae and Liu, 1997, Molecular Genetics and Genomics 154, 179-185), 두 유전자의 전장 유전자 염기서열이 비교 분석되었으며 각각 유전자의 전사 개시 부위가 확인되어 있다(Noh et al., in press, GENE). 그러나, 아직까지 식물체에서 고효율로 당 유도성을 나타내는 프로모터의 염기서열이 밝혀진 바는 없다.

20> 따라서, 보다 고효율로 저렴하게 식물체내로 유용한 외래 단백질을 대량 생산할 수 있는 일 방법으로 당 유도성 발현 프로모터에 대한 요구가 계속적으로 있어 왔다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

21> 본 발명은 상기 문제점 및 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명의 목적은 고구마 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGP1*)에서 유래된 식물체의 고효율 당 유도성 프로모터 염기서열을 제공하는 것이다.

22> 본 발명의 다른 목적은 당 유도성 프로모터 및 상기 유전자의 5' 비번역 부

위를 포함하는 식물체 형질전환용 고효율 당 유도성 발현 플라스미드 벡터를 제공하는 것이다.

- 23> 본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 저장기관, 특히 저장뿌리 조직에서 유용 물질을 대량으로 생산하고자 하는 경우, 상기 고효율 당 유도성 발현 벡터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체의 저장조직(저장뿌리 조직)에서 고효율로 발 현시키는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

- 24> 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명자들은 고구마 ADP-글루코즈 인산화 효 소 유전자(*ibAGP1*)의 프로모터 중 당 유도성 발현 프로모터를 클로닝하여서, 동일 유전자의 5' 비번역 부위를 포함시켜 식물체 형질 전환용 발현 벡터 및 일시적 발 현용 벡터를 제작하였으며 동일 벡터들의 발현을 실험을 통해 확인한 바 조직특이 성 및 당 유도성이 뛰어난 것으로 나타나 본 발명을 완성하게 되었다.

- 25> 따라서, 본 발명은 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 분리된 당 유도성 프 로모터 부위 및 고구마 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGP1*)의 5' 비번역 부 위 DNA 염기서열을 제공한다.

- 26> 상기 프로모터 염기서열은 서열번호 1의 고구마 ADP-글루코즈 인산화 효소 (*ibAGP1*)의 전사개시 부위로부터 -1 내지 -1908에서 유래된 것을 특징으로 한다(도 1 참조). 본 발명에 의한 상기 프로모터는 식물체내에서 당에 반응하여 강한 활성 이 유도될 수 있다.

- 27> 또한, 상기 비번역 부위는 서열번호 1의 고구마 ADP-글루코즈 인산화 효소 (*ibAGP1*)의 전사개시 부위로부터 +1 내지 +68에서 유래된 것을 특징으로 한다(도 1 참조). 상기 본 발명에 의한 비번역 부위는 식물체내에 도입된 유전자의 번역 효율을 높임으로써 목적 외래 유전자의 발현을 현저히 증가시킬 수 있다.
- 28> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGP1*)의 5' 비번역 부위를 포함하는 식물체의 형질전환용 고효율 당 유도성 발현 벡터(pSPagp1-101) 및 일시적 발현용 벡터(pSPagp1-221)를 제공한다.
- 29> 상기 식물체 당 유도성 발현벡터는 외래 유전자를 도입된 식물체내에서 영구적으로 발현시킬 수 있는 형질전환용 바이너리 벡터이고, 일시적 발현용 벡터는 외래 유전자를 도입된 식물체내에서 일시적으로 발현시킬 수 있는 벡터이다.
- 30> 또한, 상기 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 발현 벡터들에서, 본 발명에 의한 프로모터 및 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGP1*)의 5' 비번역 부위는 pBI101 및 pBI221 벡터에 함유된 외래 유전자의 앞에 위치한다. 본 발명에서는 GUS 리포터 유전자가 함유된 벡터(pBI101과 pBI221)에 본 발명에 의한 프로모터 및 5' 비번역 부위를 삽입한 pSPagp1-101과 pSPagp1-221(도 2a와 도 2b 참조)를 제조하였으나, 상기 GUS 리포터 유전자는 외래 유전자의 한 예로서 다른 유용한 목적의 외래 유전자로 치환할 수 있음은 당업자에게 자명하다.
- 31> 본 발명은 상기 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 고효율 발현 바이너리 벡터에 의해 형질전환된 식물체 및 상기 일시적 발현용 벡터에 의해 일시적으로 형질

전환된 저장뿌리를 제공한다.

32> 상기 식물체 당 유도성 발현 바이너리 벡터는 아그로박테리움을 이용하는 방법, 혹은 유전자 총을 이용한 방법 등으로 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에서는 그 예로서 플로랄딥(floral dip) 방법(Clough 와 Bent, 1998, Plant J.)을 이용하여 애기장대에 형질전환시켰다. 또한, 상기 식물체 당 유도성 일시적 발현 벡터는 유전자 총을 이용하여 식물체 저장뿌리를 일시적으로 형질전환시킬 수 있다. 본 발명에 의한 일시적 발현 벡터는 저장뿌리 작물의 종류에 상관없이 형질전환시킬 수 있으며, 작물의 예로서 당근 등을 들 수 있다.

33> 또한 상기 외래 유전자는 식물체내에서 많은 양의 전분을 축적하기 때문에 비교적 당 함량이 높은 저장기관에서 대량 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 식물체 당 유도성 고효율 발현 벡터들에서 상기 프로모터 및 고구마 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자의 5' 비번역 부위의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.

34> 나아가, 본 발명은 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 발현 프로모터 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 2 내지 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머를 제공한다.

35> 본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas*) 유래 ADP-글루코즈 인산화 효소 유전자(*ibAGP1*)의 프로모터 중 당 유도성 발현 프로모터 부위 및 그 유전자의 5' 비번역 부위에 관한 것으로써, 이는 식물체내에서 당 유도성 발현을 유도하며 특히 많은 양의 전분을 축적하기 위해 당 함량이 높은 저장뿌리에서는 높은 정도의 발현을 유

도한다. 그러므로 본 발명은 식물의 저장뿌리에서 유용 의료, 산업용 단백질(예, Interferon, growth hormone, Lactoferrin, Phytase 등)을 대량으로 생산하고자 하는 형질전환 식물체 개발에 효과적으로 이용될 수 있다.

36> 이하, 실시예를 통해 본 발명을 상세히 설명한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예들에 의하여 한정되는 것은 아니다.

37> 실시예 1: 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자(*ibAGP1*)의 당 유도성 발현 프로모터의 클로닝

38> 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자(*ibAGP1*)의 프로모터는 고구마(*Ipomoea batatas* cv Yulmi) ADP-글루코즈 인산화 유전자(*ibAGP1*)(Noh et al., *GENE*, in press)의 5' 영역 염기서열을 결정하여 확인하였다.

39> 이렇게 확인된 1,908 bp 프로모터 염기서열을 GenBank에 등록하였다 (Accession no. AY694185)(도 1 참조). 상기 도 1은 본 발명에 의한 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 고구마 유래 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위 염기서열을 나타내는 도면이다. 도 1에서 단백질 합성 개시 코돈 'ATG'는 밑줄친 굵은 글씨체로, 전사개시 부위인 염기 'A'는 '+1'로 표시하였다.

40> 실시예 2: 식물체 당 유도성 발현 벡터 및 일시적 발현 벡터의 제작

41> 실시예 1에서 클로닝된 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자(*ibAGP1*)의 당 유도성 발현 프로모터와 68 bp 5' 비번역 부위(염기서열 1, 도 1 참조)를 pBI101과 pBI221 벡터(Clontech)에 삽입하여 식물체 당 유도성 발현 벡터 및 일시적 발현 벡터를 각각 제작하였다.

42> 먼저, 식물체 당 유도성 발현 벡터의 제작에 대해 구체적으로 살펴보면, 상기 염기서열 1의 클로닝된 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자(*ibAGP1*)의 당 유도성 발현 프로모터와 68 bp 5' 비번역 부위를 표 1에 나타나 있는 프라이머들을 사용하여 PCR로 증폭시켜서, SalI과 BamHI으로 절단한 다음 pBI101의 SalI, BamHI 위치에 삽입하여 pSPagp1-101으로 명명하였다(도 2a 참조). 이때 PCR은 94℃에서 5분간 처리 후, 94℃-1분, 55℃-1분, 72℃-1분 30초를 30회 수행한 후 72℃에서 10분간 처리하였다.

【표 1】

43>	5' 프라이머	5 '-CGAGTCGACACTGATACTTTGGTGACT-3'	서열번호 2
	3' 프라이머	5 '-TGCGGATCCTTTTAAGCCGGGCTACCA-3'	서열번호 3

44> 도 2a에서 GUS는 베타-글루쿠로니다제 II(β -glucuronidase II)를 코딩하는 카나마이신(kanamycin) 저항성 마커 유전자이고, Nos-pro와 Nos-ter는 NPTII의 식물체 발현 프로모터와 터미네이터이다. 그리고 GUS 리포터 유전자는 삽입된 프로모터와 Nos(Nopaline synthase) 터미네이터(Nos-ter)에 의해 식물체에서 발현된다.

45> 한편, 식물체 당 유도성 일시적 발현 벡터의 제작은, 상기 염기서열 1의 클로닝된 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자(*ibAGP1*)의 당 유도성 발현 프로모터와

68 bp 5' 비번역 부위를 표 2에 나타나 있는 프라이머들을 사용하여 PCR로 증폭시켜서, SphI과 BamHI으로 절단한 다음 pBI221의 SphI, BamHI 위치에 삽입하여 pSPagp1-221으로 명명하였다(도 2b 참조). 이때 PCR은 94℃에서 5분간 처리 후, 94℃-1분, 58℃-1분, 72℃-2분을 30회 수행한 후 72℃에서 5분간 처리하였다.

【표 2】

46>

5' 프라이머	5 '-CGCGCATGCACTGATACTTTGGTGACT-3'	서열번호 4
3' 프라이머	5 '-TGCGGATCCTTTTAAGCGCGCTACCA-3'	서열번호 5

47>

실시에 3 : 제작된 pSPagp1-101 벡터를 이용한 애기장대 형질전환

48>

실시에 2에서 제작된 pSPagp1-101 벡터를 아크로박테리움(*Agrobacterium tumefaciens* C58C1)에 냉-해동(Freeze-thaw) 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)으로 도입하였다.

49>

형질전환된 아그로박테리아(Agrobacteria)는 2일 동안 28℃에서 진탕 배양한 후, 플로랄딤(floral dip) 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 근거하여 애기장대(*Arabidopsis thaliana* cv. columbia)의 개화직전 암술머리에 접종하여 애기장대 식물체를 형질전환시켰다.

50>

실시에 4 : 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 및 효소학적 분석

51>

실시에 3에서 제조된 애기장대 형질전환체로부터 종자를 수확한 다음, 카나

마이신(kanamycin, 30 mg/L)을 함유하는 MS 배지에 도말하여 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별하였다.

52> 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법 및 효소학적 방법을 이용하여 조사하였다. 각 형질전환 식물체의 전 조직을 염색하기 위하여, 식물체의 각 조직은 1mM G-glu(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide), 100mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담구어 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 100% 에탄올을 부가함으로써 조직에 존재하는 클로로필을 제거했다.

53> 그 결과, 도 3 에서 나타난 것처럼 pSPagp1-101로 형질전환된 애기장대의 잎과 체관조직, 꽃대의 줄기, 뿌리 정단 부위에서 강하게 GUS의 활성이 확인되었으며, 꽃가루에서는 약한 GUS 활성을 확인하였다.

54> 실시에 5: 본 발명에 의한 당 유도성 발현 프로모터(*ibAGP1* 프로모터)의 당 유도성 확인

55> *ibAGP1* 프로모터의 당 유도성 확인하기 위해, 상기 형질전환 애기장대에 당 (sucrose) 농도를 조절한 후 GUS의 활성을 정량적으로 조사하였으며, 이 때 Jefferson et al., (EMBO J. 6: 3901-3907, 1987) 방법을 사용하였다.

56> 구체적으로는 형질전환 애기장대의 종자를 0.5%, 3%, 6% 당을 함유하는 MS

배지에 파종한 후 14일간 배양한 후, 어린 식물체들을 수거하여 50mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium lauroylsarcosine, 그리고 10 mM β -mercaptoethanol을 함유하는 용액에서 마쇄한 다음, 12,000 x g에서 원심분리하여 상등액을 취했다.

57> 획득된 상등액은 1mM MUG (4-methylumbelliferyl glucuronide)와 섞어 37°C에서 반응시킨 다음, 0.2M Na₂CO₃를 넣어 반응을 종료시켰다. 반응이 종료된 반응액은 형광계(fluorometer)를 이용하여 365 nm와 455 nm 파장에서 값을 측정한다. 다음, 측정된 값은 MUG 표준용액을 이용하여 만든 표준 곡선과 비교함으로써 GUS 활성을 계산하여 도 4에 나타내었다.

58> 도 4에서 보여지는 GUS 활성도는 각 당 처리별로 얻어진 12개 형질전환체(T2 식물체)를 분석하여 얻어진 값이다. pBI101 벡터는 프로모터가 없는 벡터이며 CaMV35S 프로모터는 pBI121(Clontech, USA) 벡터를 사용하여 실험하였다. 그 결과 고구마 *ibAGP1* 유전자 프로모터는 3% 당에 의해 GUS 활성이 8배, 6% 당에 의해 11배 정도 활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 한편, 보편적으로 쓰이는 CaMV35S 프로모터에 비해서는 12 내지 15배 증가된 활성을 확인하였다.

59> 실시에 6: 당근 저장뿌리 조직에서 당 유도성 발현 프로모터(*ibAGP1* 프로모터)의 활성 확인

50> *ibAGP1* 프로모터의 활성을 식물의 저장뿌리 조직에서 확인하기 위하여, 실시

예 2에서 제작된 pSPagp1-221 벡터로 당근의 저장뿌리에서 일시적 발현 분석을 실시하였다. 이를 위하여, 비대 성장 중인 직경 2 cm 이하 당근의 저장뿌리를 채취하여 세척한 다음, 저장뿌리의 단면을 약 5mm 두께로 절단하여 습도가 충분히 유지되는 상태로 페트리 디쉬에 넣어 4℃에서 4-5시간 방치한다.

51> Sanford 등(1993, *Meth Enzymol* 217:485-509)의 방법에 따라 직경 1.0 μm 의 골드입자에 DNA를 섞어서 코팅하고 DNA 농도 1.0 μg , 헬륨가스 압력 1,350 PSi, 당근과의 거리를 6 cm로 조절하여 밤바딩(bombarding)하였다.

52> 밤바딩한 후 25℃, 암 상태에서 24시간 동안 방치한 후 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 확인하였다. 당근의 절단된 저장뿌리 조직을 염색하기 위하여, DMSO(dimethyl sulfoxide)에 녹인 X-glu(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide) 1 mM, 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1 % Triton X-100을 함유하는 용액에 담구어 37℃에서 24시간 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 70% 에탄올에 24시간, 그리고 100% 에탄올을 매일 갈아주면서 수일간 방치하여 조직에 존재하는 색소를 제거하였다.

53> 그 결과, 도 5 에서 보는 것처럼 pSPagp1-221은 당근 저장뿌리 전 조직에서 강한 활성을, 특히 저장뿌리의 직경이 커질수록(식물체내 당 함량이 높아질수록) 강한 활성을 확인할 수 있었다.

54> 이상의 결과를 종합해 본 결과, 본 발명에 의한 프로모터는 식물체내에서 당 함량이 높은 저장기관 조직에서 매우 강한 활성을 나타냄을 알 수 있다.

【발명의 효과】

55> 상술한 바와 같이, 본 발명에서는 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 당 유도성 발현 프로모터와 동일 유전자의 5' 비번역 부위를 포함하는 프로모터를 pBI101과 pBI221에 삽입시켜서 바이너리 식물체 발현 벡터와 일시적 발현에 의한 분석용 벡터를 제조하였으며, 애기장대 형질전환체에서 조직별 활성을 조사하였으며, 3% 와 6% 당 처리에 의해 본 발명에 의한 프로모터의 활성이 8배 내지 12배 증가함을 보였다. 한편, 일시적 발현 분석에 의해 동일 프로모터가 당근 저장뿌리에서 매우 강하게 활성을 나타냄을 확인하였다.

56> 따라서, 본 프로모터는 형질전환 저장뿌리 조직에서 유용 단백질을 대량으로 생산하고자 할 때, 혹은 형질전환체를 이용한 저장뿌리 조직의 대사 조절 및 기능성 물질 생산 등에 효과적으로 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

서열번호 1의 전사 개시 부위로부터 -1 내지 -1,908 부위의 염기서열을 포함하는 식물체 당 유도성 발현 프로모터.

【청구항 2】

서열번호 1의 전사 개시 부위로부터 +1 내지 +68 부위의 염기서열을 포함하는 식물체 당 유도성 발현에 유용한 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위.

【청구항 3】

서열번호 1의 전사 개시 부위로부터 -1 내지 -1,908 부위 염기서열의 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 서열번호 1의 전사개시 부위로부터 +1 내지 +68 부위 염기서열의 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위를 포함하는 식물체 당 유도성 형질전환용 바이너리 벡터.

【청구항 4】

서열번호 1의 전사 개시 부위로부터 -1 내지 -1,908 부위 염기서열의 식물체 당 유도성 발현 프로모터 및 서열번호 1의 전사개시 부위로부터 +1 내지 +68 부위 염기서열의 고구마 ADP-글루코즈 인산화 유전자의 5' 비번역 부위를 포함하는 식물체 당 유도성 일시적 발현 분석용 벡터.

【청구항 5】

제3항 기재의 식물체 당 유도성 형질전환용 바이너리 벡터를 포함하는 대장균.

【청구항 6】

제4항 기재의 식물체 당 유도성 일시적 발현 분석용 벡터를 포함하는 대장균.

【청구항 7】

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 2 및 서열번호 3으로 표시되는 PCR용 프라이머.

【청구항 8】

서열번호 1의 염기서열을 포함하는 DNA 단편을 증폭하기 위한 서열번호 4 및 서열번호 5로 표시되는 PCR용 프라이머.

【도면】

【도 1】

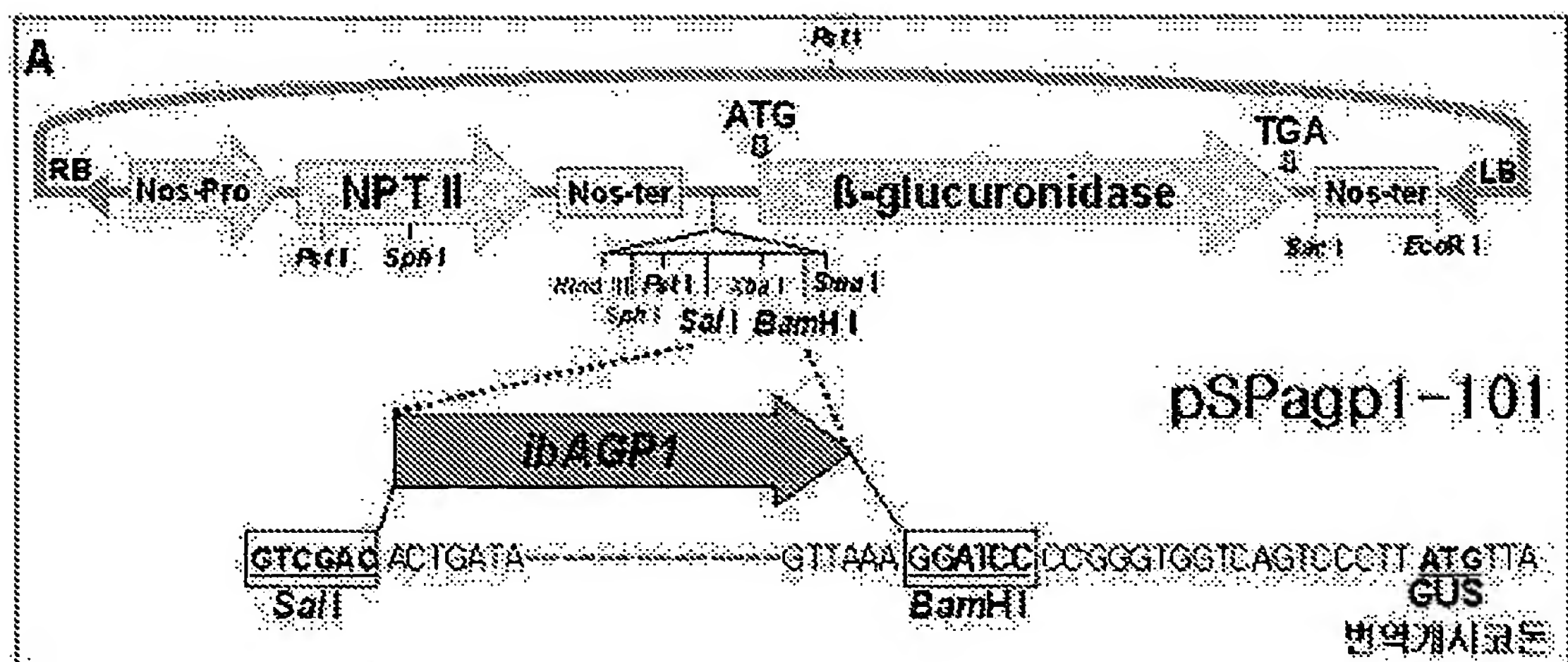
-1908

ACTGATTC TTGGT GACTG CATTGT GTTGGGTC TTGCCAAATCTATTGAGGGAGGGGAAAGAAAGTAGAA
GTGTCAGG SATDGG TGTGTGGTGGGGTTTC CAAAGTTCCCTCTTTTCCTTCTTATTCCTTAGTTTGGCTC
GTCATAAGTGTGAGGGATTGGTAACCAATAGAAATCTCATCTTAAACCTAATATGTTCTAGTATCAT
AATTAAGCTCTTAC TCAAGGAATGTTCCTATTAGGTCATTTTAAATGTCTATCAATTGATCATTTCAAG
TAAACAAAACCTCTGGCTCTAATGCTGGGACTTGGGTTTCTTTATTATGCACTNTTATGGGATAAAGGTTG
GTTATGGTGGCATCCCCGGGCCATCAATCGGAAGAGATGGA GCTCCTGCTCCAGGAGGGGGTTGCTGCAG
CTGAAAATGGGACGTAATTTCTTTTGAATAATGCTTGTTCATTSTNAATTGCTGACTAATTGTTCTTT
GTTTTC AATTGTTCAAAA GCTTAC TATGTATACGTGGTGTATAATGTAAATCAACAGCCASCATIAGGA
TGNAAATAGAGGTTTCAAATTAACCTCAACAGAAATCTGCTTATTTTCGAGAA TTAATACTTCTCAA
AATAAATAAATAAATCATGAGATGTTGTATATAAATAAATAAATCATGAGATGTTGTGAGGCTCTTCA
AGTTTTCACAGTTGTATGAATAATGAGGAGCAGATGATAGTTAGAGAACTTAGGAGCATGGAATCTGGT
GCTTGGGCTGATCGATTATGGCATGATGCACTGCTTCACTGATAGGCTGATTTG CAGGCATTAGAT
CTTGGTTTATGGTCTGCATTTTACGTTGGGGTGACCA TTTTG TSCCGTTTCCGTCAGCCACTTAAATGGAC
CAACATCCCCGAGGAGAGACCTGCAATTCAGACTTAGACA CACTAATTATAGGGGCATATGATATTAAG
ATTGGATAATGGCTGATGAAATTTTCAGCCGTTAATTC TAAACAAATAAACAGTATGGCGGCTATGAAAG
ATAACGATCTTTAAGCTGAGATGGGCAAAACAATA TGGATCGTCTA CTAGTATTTGTCTCTTTCCTAT
CCTGCTGTCTACACCAAAATATAAAGAC CAAAAC TTGAGTGACTGAGAGAAATATGCATTCATTATCC
GAGTCTGTATCATGTAAATTTTATCTTGTAAATTTTAACTAATAAATAATCAGGAGAAAATCAGCCATAAT
TATTTATAGCTCATAACTTACTAGTTTCAGACTAAGAAGACTAATAAACAATCCCCGTTACAAAATTAA CA
TTTGGACTAACTTGTAACGTTTGCA TGCTCAGAAACAGGATACACCAACTTTGGTTTGTGATGATGATA TC
ATATCATAAACAAACCTTC AAAAAGTCACTTGCAAGGTGSCACTTTGCGAGAGACCA CCAATGCTTAAATY
GCTCATAAATGAGCTAAACTATTATTATTACTTTATATAAATA TTTTCGCCCCATCATATTAATTGCGCA
ATAATATA TCAATTTATCTGTCTTACTTATTATTTATTAATTACATAAATGAAACGGAATGAATAACAT
AAA TAAATAAAGATATAC TCCGTA TAAATAACGGTGCAAGGAGCC GATTAGATATTTTCAGTAAATCAC
AAGTCACATGTGATCATATCATGTG TATTTTTCATATAAATAA AAAC TAGTATACCCCACTCTGATTTT
GCTCTAAACTTCCAAATATACCTTGTGTCAGCAAA TGCTAGCCGCTGCTTGGGAAGGGCAAA CCGTAAA
TGTGACAAATTC TTTGGCAATTAGGTAATAGGTGTCACTATTTTAAACACTTACTATAAAGGACGCT
AGTTTCTGTCCAAA TTTC

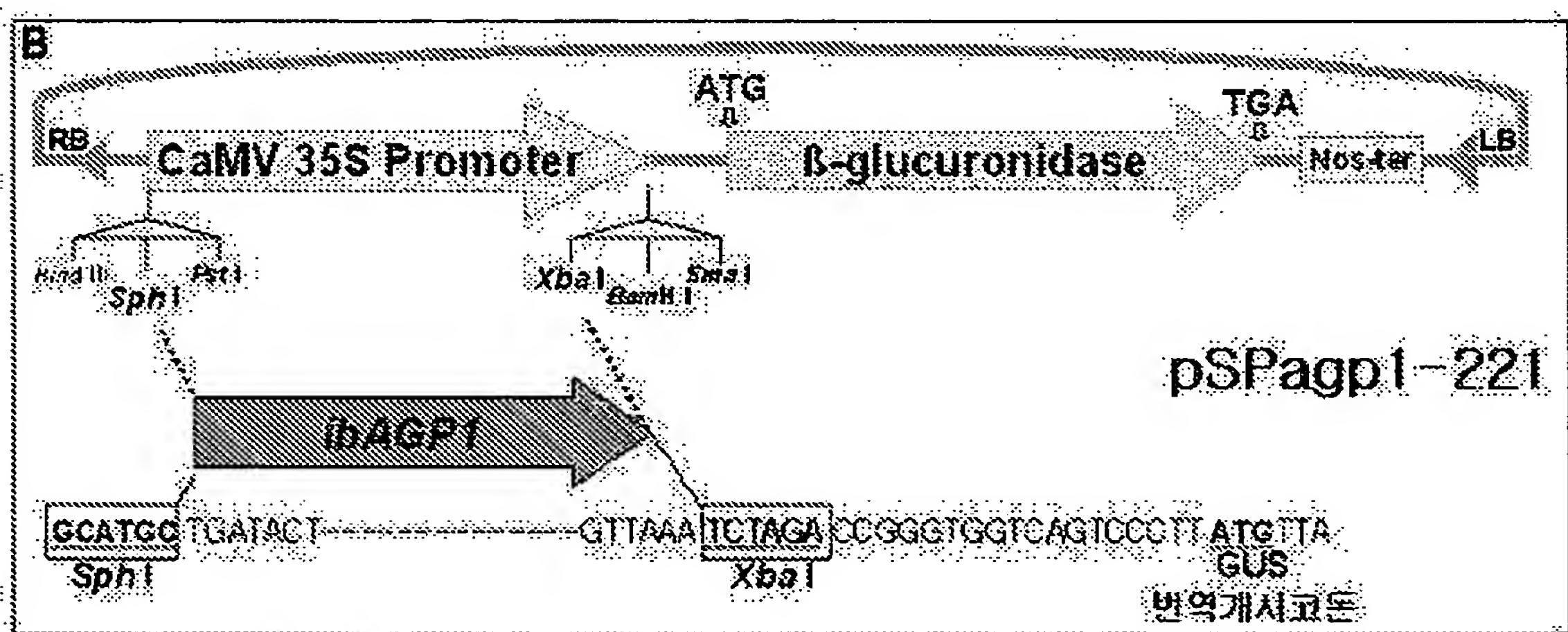
+1

AACAGAAATCACTCGCTTCCACACACTCCAAAGTCCGCAGAGAGCTCAGAGTGGTAGCGCGGCTTAAAAATG

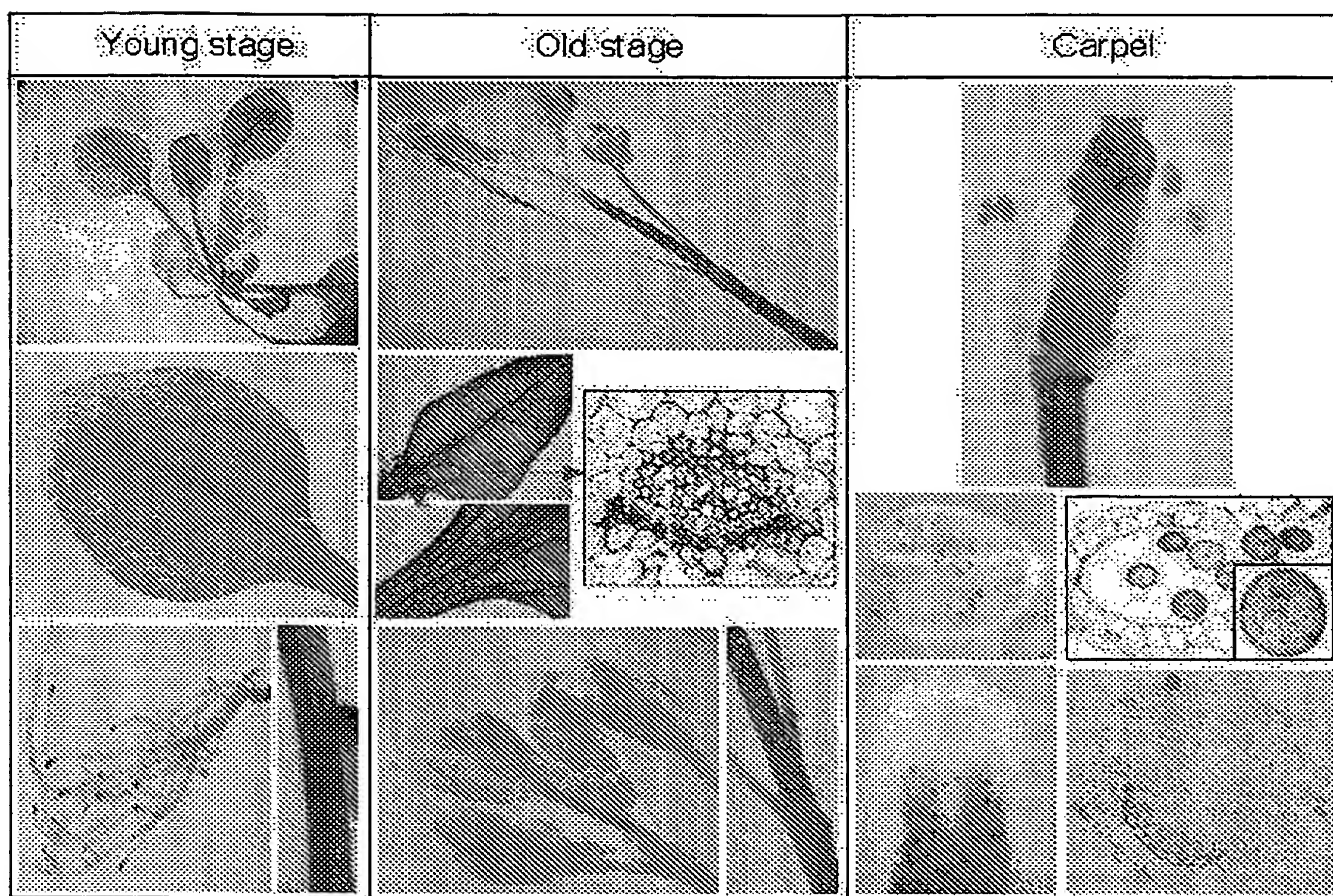
【도 2a】



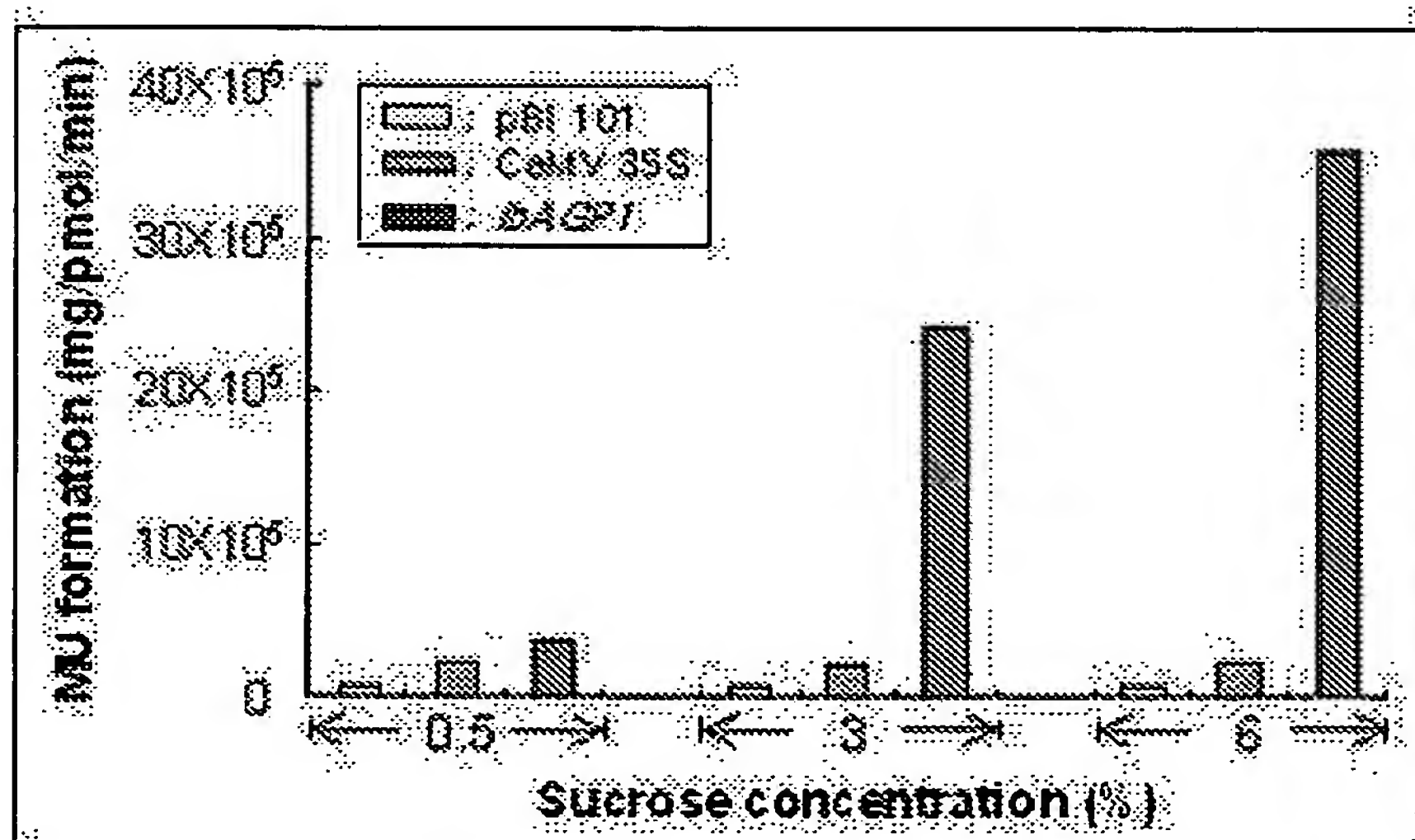
【도 2b】



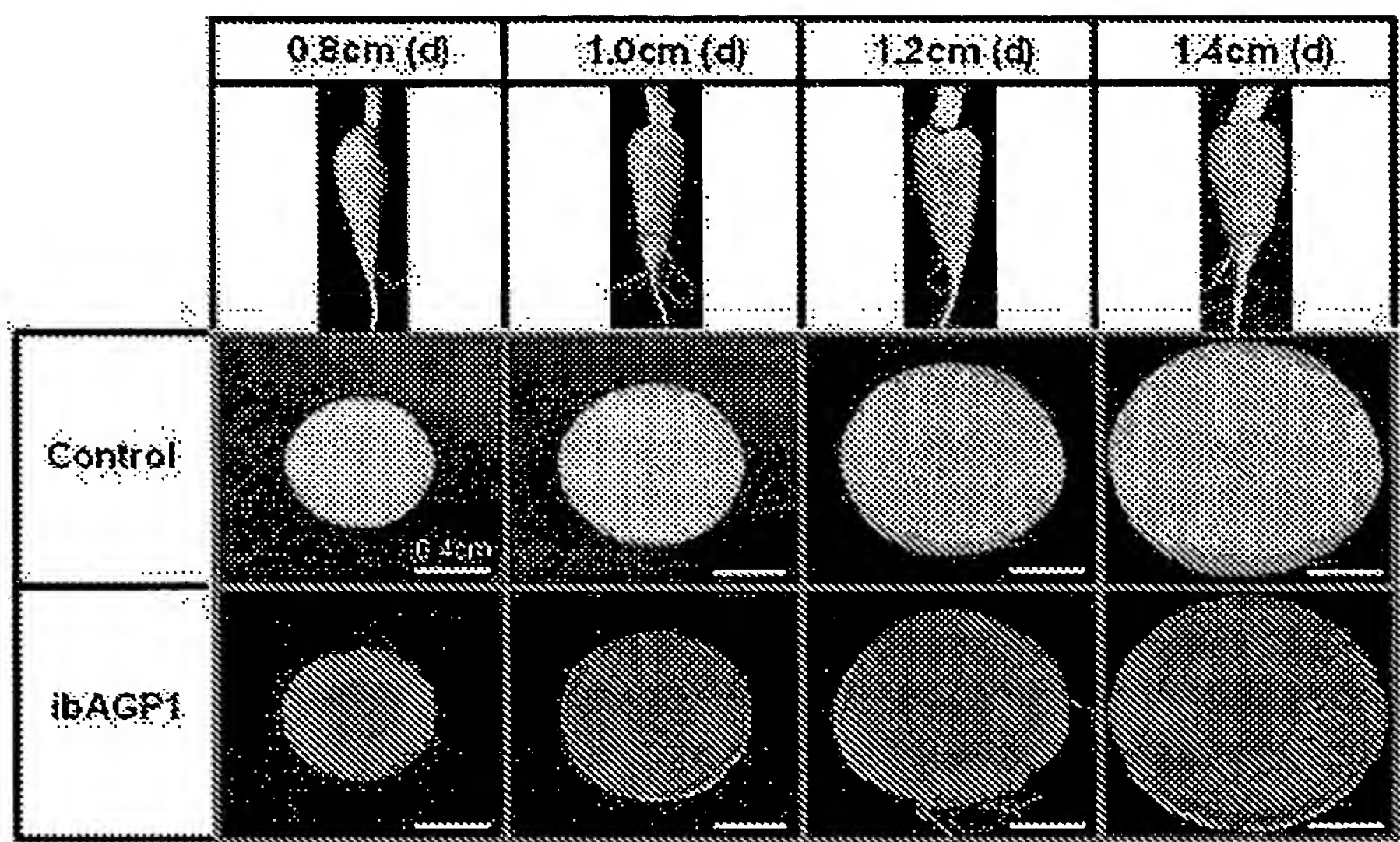
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

-

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation

<120> DNA nucleotide sequence for directing sucrose-inducible high level expression in plant and plasmid vector using the same

<130> P11-040830-01

<160> 5

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1979

<212> DNA

<213> Ipomoea batatas cv Yumli

<400> 1

actgatactt tggtagactgc attgtgtttg ggtcttgcca aatctattga gggaggggaa 60

gaaagtagaa gtgtcaggga ttggtgtgtg gtgggggttc caaagtttcc ctcttttct 120

ttcttattct tagtttgctc gtcataagtg tcagggttg gtaaccaata gaaatctcat 180

ctttaacctt tatgtatgtt ctagtatcat aattaagctc ttactcaaag gaatgttcca 240

tttaggtcat ttttaatgtc tatcaattga tcatttcaag taaacaaaac tctggctcta 300

atgctgggac tttggtttct ttattatgca gtnttatggg ataaagggtg gttatggtgg 360

catcccgggg ccatcaatcg gaagagatgg agctcctgct ccaggagggg gttgctgcag 420

ctgaaaatgg gacgtaattt cttttgagta aatgcttggt tcattgtnaa ttcgtgacta 480

attgttcttt gtttttcaat tgttcaaaag ctactatgt atacgtggtg tataatgtaa 540

tacaacagcc agcattagga tagnaatagag gtttcaaatt aaactcaacc agaatcctgc 600

ttatttcgag aattactacc attctcaaaa aataaataaa taaatcatga gatgtgttga	660
tataaataaa taaatcatga gatgtgttga acgctcttca agtttttcac agttgtatga	720
ataatgacga gcacatgata gttagagaac ttaggagcat tgaatctggt gcttgggctg	780
atcgatttat ggcatgatgc agtgcattca ctgtatagcg tgtgattgca ggcattagat	840
cttggtttat ggtctgcatt tcacgtgggg tgaccatttt gtgccgtttc cgtcagccac	900
ttaaattggac caacatcccc tgaggaagac ctgcaaattc agacttagac acactaatta	960
taggggcata tgatattatg attggataat ggctgatgaa attttcagcc gttaattcta	1020
aacaataaac agtatggcgg tctatgaatg ataacgatct ttaagctgaa gatgggcaaa	1080
acaatatgga tcgtctacta gtatttgtct cttccctat cctgcttgc tacaccacaa	1140
tactaaagac caaaacttga gtgactgaga gaaatatgca ttcattatcc gagtctgtat	1200
catgtaaatt ttatcttgta attttaacta ataaaaaatc aggagaaaat cagcctaaat	1260
tatttatagc tcataactta ctagttcaga ctaagaagac taataaaaca tccccgttac	1320
aaaattaaca tttgactaa ctgtgaacgt ttgcatggtc agaaacagga tacaccaact	1380
ttggttgtga tgatgatatc atatcataaa caaacctcc aaaaagtcac ttgcaaggtg	1440
gcactttgcg acagaccacc atgcttaatt gtcataatc agctaaacta ttattattac	1500
tttataaat attttcgccc catatcatat aatttggcca ataatatatc attttatctg	1560
tcttacttat tatttattaa ttacataaaa tgaaacggaa tgaataacat aaataatata	1620
aagatatact ccgtataagt aacggtgcaa aggagccgat tagatatattt cagtaatcac	1680

aagtcacatg tgatcatatc atgtgtatTT ttcatataaa ataaaactag tataccccac	1740
cctgattttt gctctaaact tccaaatata cccttgggtca cgcaaagtct agccgctggt	1800
ttggaagggc aaaccgtaaa tgttgacaaa ttctttggca attaggtaat aggtgtcacc	1860
tatttgaaca ctactataa aaggacgcct agtttctgtc caaatttcaa cagaatcact	1920
cgcttcaca cactccaaag tccgcagaga gctcagagtg gtagcgcggc ttaaaaatg	1979

<210> 2
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer for PCR

<400> 2	
cgagtcgaca ctgatacttt ggtgact	27

<210> 3
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer for PCR

<400> 3	
tgcggatcct ttaagccgc gctacca	27

<210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer for PCR

<400> 4
cgcgcatgca ctgatacttt ggtgact

27

<210> 5
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer for PCR

<400> 5
tgcggatcct ttaagccgc gctacca

27

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR05/002820

International filing date: 25 August 2005 (25.08.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2004-0070820
Filing date: 06 September 2004 (06.09.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 12 September 2005 (12.09.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.